

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭60-211350

⑬ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和60年(1985)10月23日

G 01 N 27/30
27/46

E-7363-2G
A-7363-2G

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 バイオセンサ

⑯ 特 願 昭59-69337

⑰ 出 願 昭59(1984)4月6日

⑱ 発 明 者	河 栗 真 理 子	門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑱ 発 明 者	南 海 史 朗	門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑱ 発 明 者	飯 島 孝 志	門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑲ 出 願 人	松下電器産業株式会社	門真市大字門真1006番地	
⑲ 代 理 人	弁理士 中尾 敏男	外1名	

明 細 書

1、発明の名称

バイオセンサ

2、特許請求の範囲

- (1) 絶縁性の基板に少なくとも測定極と対極からなる電極系を2組設け、一方の電極系の上部を酸化還元酵素および酸化還元酵素と共役する酸化型色素を含有した多孔体で被覆し、他方の電極系の上部を前記酸化型色素を含有した多孔体で被覆したことを特徴とするバイオセンサ。
- (2) 前記電極系が測定極、対極および参照極からなり、すべて白金で構成された特許請求の範囲第1項記載のバイオセンサ。
- (3) 多孔体が親水性の多孔体膜である特許請求の範囲第1項記載のバイオセンサ。
- (4) 酸化還元酵素及び酸化型色素が多孔体膜に乾燥状態で保持されている特許請求の範囲第3項記載のバイオセンサ。

3、発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、種々の生体試料中の特定成分を迅速にかつ精度よく容易に定量することのできるバイオセンサに関する。

従来例の構成とその問題点

近年、酵素の有する特異的触媒作用を利用した種々のバイオセンサが開発され、特に臨床検査分野への応用が試みられている。検査項目及び検体数が増加している現在、迅速に精度よく測定できるバイオセンサが望まれている。

グルコースセンサに例をとると、糖尿病の増加が激しい今日、血液中の血糖値を測定し管理するには、以前のように血液を遠心分離し血漿にして測定するのでは非常に時間がかかるため、全血で測定できるセンサが要求されている。簡易型としては、尿検査の時に使用されている検査紙と同様に、スティック状の支持体に糖(グルコース)にのみ反応する酵素および酵素反応時又は酵素反応の生成物により変化する色素を含有する担体を設置したものがある。この担体に血液を添加し、一定時間後の色素の変化を目又は光により測定する

方式であるが、血液中の色素による妨害が大きく精度は低い。

そこで、第1図のような多層式の分析担体が開発されている。透明な支持体1の上に試薬層2、展開層3、防水層4、戸過層5が順に積層した構造となっている。血液サンプルを上部から滴下すると、まず戸過層5により血液中の赤血球、血小板などの固形成分が除去され、防水層4にある小孔から展開層3へ均一に浸透し、試薬層2において反応が進行する。反応終了後、透明な支持体1を通して矢印の方向から光を当て、分光分析により基質濃度を測定する方式である。従来の簡易なスティック状の担体にくらべ、複雑な構造であるが、血球除去などにより精度は向上した。しかし、血液の浸透および反応に時間がかかるため、サンプルの乾燥を防ぐ防水層4が必要となったり、反応を速めるために高温でインキュベートする必要がある、装置および担体が複雑化するという問題がある。

最近、酵素反応と電極反応を結びつけて基質濃

度を測定するバイオセンサが開発されている。

本発明者らもこの考えを基に第2図のようなバイオセンサを試作した。すなわち、絶縁性の基板6に白金を埋め込み、測定極7、対極8、参照極9として電極系を構成する。この電極系の露出部を覆うように多孔体10を設置し、酸化還元酵素11と酸化還元酵素と共役する酸化型色素12を担持させる。前記多孔体10に生体試料液を含浸させると、多孔体に担持された酸化還元酵素11により基質が酸化され同時に酸化還元酵素と共役する酸化型色素12が還元される。この還元された色素を前記電極系で酸化することにより、得られた酸化電流値から基質の濃度が検知できる。このように、電極反応により測定基質濃度ができるため、生体試料中の色素に妨害されることはなくなった。又、酵素および色素を充分量担持させることにより、高濃度まで測定が可能となり、生体試料液を希釈することなく、適当量含浸させるだけで短時間に精度よく測定できるようになった。

しかし、生体試料中には、アスコルビン酸や尿

酸のようにそれ自身電極上で直接酸化される物質が含まれている場合があり、測定結果に正の誤差を与える問題があった。又、担持している酸化型色素が生体試料により還元されて誤差となる場合もあった。

発明の目的

本発明は、上記の問題点を克服し、生体試料中の特定成分を簡易に、迅速かつ精度よく測定できるバイオセンサを得ることを目的とする。

発明の構成

本発明のバイオセンサは、絶縁性の基板上に少なくとも測定極と対極からなる2組の電極系を有し、一方の電極系の上部を酸化還元酵素および酸化還元酵素と共役する酸化型色素を含有した多孔体で被覆し、他の電極系の上部を前記酸化型色素を含有した多孔体で被覆したことを特徴とする。

本発明のバイオセンサを用いることにより、生体試料の測定を、妨害物質の影響を除去して、精度よく簡易に測定することができる。

実施例の説明

本発明のバイオセンサの1つとして、グルコースセンサを例に説明する。第3図にグルコースセンサの一実施例の模式図を示す。塩化ビニル樹脂からなる絶縁性の基板6に白金を埋め込み、測定極8、8'、対極9、9'、参照極10、10'とする。前記電極系を覆うようにナイロン不織布13、14を設置する。このナイロン不織布13は、酸化還元酵素としてグルコースオキシダーゼ14と酸化還元酵素と共役する酸化型色素としてフェリシアン化カリウム15を溶解含浸後乾燥状態で担持している。ナイロン不織布14はフェリシアン化カリウム15のみ溶解含浸後乾燥状態で担持している。

このセンサに血液を添加すると、ナイロン不織布13において血中のグルコースがグルコースオキシダーゼ14により酸化される際、フェリシアン化カリウム15が共役して還元されフェロシアン化カリウムが生成する。このフェロシアン化カリウムおよび血中の妨害物質(たとえばアスコルビン酸や尿酸)を参照極10を基準に測定極8の

電位を0Vから+0.5Vまで0.1V/秒の速度で掃引することにより酸化する。この時得られた酸化電流値はグルコースと妨害物質の関与したものである。他方、ナイロン不織布16においては、グルコースオキシダーゼが存在しないため上記と同様にして得られた酸化電流値は妨害物質のみが関与したものであり、上記の酸化電流値から差し引くことにより真のグルコースに關与した酸化電流値が得られ、グルコースの濃度が検知できる。グルコースの標準液で測定したところ、妨害物質による応答はなく、800mg/dlまでグルコースの濃度とよい直線性を示した。

グルコースの標準液(濃度150mg/dl)にアスコルビン酸を添加し、第2図のように電極系が1組のものBと、第3図に示した本発明のグルコースセンサAで測定したところ、第4図のように、グルコースセンサAではアスコルビン酸を添加しても60mg/dlまで影響を受けなかったが、従来のセンサBでは、添加したアスコルビン酸により電流値が増加した。血液中や尿中にはアスコルビ

ン酸以外にも尿酸、グルタチオン、ヘモグロビンなどのように電極上で直接酸化を受けるものが含まれているが、グルコースオキシダーゼのみを除いた系において得られた電流を差し引くことにより、妨害されずに精度よくグルコース濃度を測定することができた。

測定極及び対極からなる2電極系においても測定が可能である。その際は電流値を安定させるために対極が少なくとも測定極の2倍以上の面積を必要とした。これは、基準となる対極の電位が電流を流すことにより動いてしまうからである。又、銀塩化銀を対極に用いると電位は安定し面積を大きくする必要はなくなったが、製造する手間および組み込みの点で不便であった。

参照極を設置して安定な白金を用いて3電極系にすることによって電位が安定し、測定極、対極、参照極が同面積でも精度よく測定することが可能となった。これにより、小型化が可能となった。

又電極を形成する場合、白金を直接埋め込むだけでなく、スパッタ法あるいは蒸着法により絶縁

性の基板に白金層を形成し電極とすることもでき、自由に形や面積を調節でき、特に同一の電極を大量に製造する時、効果が大きであった。

酸化型色素としては、上記に用いたフェリシアン化カリウムが安定に反応するので適しているが、P-ベンゾキノンを使えば、反応速度が早いので高速化に適している。又、2,6-ジクロロフェノール、インドフェノール、メチレンブルー、フェナジンメトサルフェート、 β -ナフトキノン-4-スルホン酸カリウムなども使用できる。

酸化型色素および酵素を含む多孔体は、試料液を速やかに吸収して酵素反応を行わせることができるように、親水性の多孔体膜であることが望ましい。たとえば、ろ紙やパルプの不織布、セラミック多孔体などを用いると、試料液が均一にすばやく浸透し再現性も良好であった。さらにナイロン不織布において、界面活性剤で処理したものは、処理しなかったものよりすみやかに液が浸透し、再現性が向上した。

酸化型色素のみ又は酸化型色素と酵素を細かく

粉碎後加圧して成形体として電極上に設置することもできる。この加圧成形体に血液を添加すると、速やかに浸透し迅速に反応した。なお、酸化型色素と酵素を加圧成形する際、 SiO_2 のような結着剤を少量混合すると、成形体の強度が増すので取り扱いが簡易となる。結着剤としては、酵素反応及び電極反応に無関係で親水性のものが適している。

酸化型色素および酵素は、なるべく血液の液体成分に早く溶ける状態にしておくことが望ましい。そこで、色素の溶液をナイロン不織布に浸漬後、ドライヤーにより熱風乾燥すると、真空乾燥したものより非常に細かい結晶となり、液体に溶けやすくなった。又、色素の溶液を浸漬したナイロン不織布を、エタノールのような水に溶ける有機溶媒中に浸漬後、真空乾燥すると、さらに細かい結晶を担持することができた。酵素は熱などにより活性が失活するので、浸漬後真空乾燥した。

本発明のセンサは、グルコースに限らず、アルコールセンサや、鮮度に関係するイノシンセンサなど酸化還元酵素の関与する系に用いることがで

きる。酵素は固定して担持してもよく、固定化することにより、酵素の活性を長期間安定に保持することができる。

発明の効果

以上のように、本発明によれば、妨害物質の影響を簡単に除去でき、かつ精度の高い応答を迅速に得ることができる。

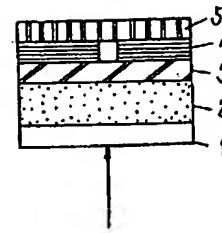
4、図面の簡単な説明

第1図および第2図は従来のグルコースセンサの模式図、第3図は本発明の実施例のグルコースセンサの模式図、第4図は本発明の実施例であるグルコースセンサおよび従来のグルコースセンサの応答例を示した図である。

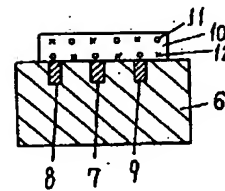
6……基板、7……測定極、8……対極、9……参照極、10……多孔体、11……酵素、12……色素、13, 16……ナイロン不織布、14……酵素、15……色素。

代理人の氏名 弁理士 中 尾 敏 男 ほか1名

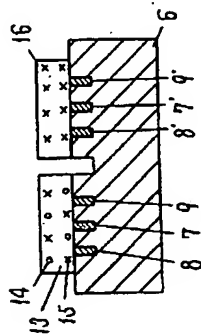
第 1 図



第 2 図



第 3 図



第 4 図

